

1772 0300 0210 #5 4E 382.1019 4/12/99

UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

Re: Application of: Toru IMAMURA, et al.

Serial No.: 09/121,017

Filed: July 22, 1998

For:

**HEPARIN-BINDING PROTEINS MODIFIED
WITH SUGAR CHAINS, METHOD OF
PRODUCING THE SAME AND
PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS
CONTAINING THE SAME**

RECEIVED

NOV 23 1998
PATENT & TRADEMARK OFFICE
TECHNOLOGY CENTER 3700

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

November 16, 1998

Sir:

Further to our Letter re Priority dated July 22, 1998, applicants hereby submit a certified copy of the priority application: Japanese Application No. 307721/1997 filed November 10, 1997.

RECEIVED

JAN 19 1999

RECEIVED

JAN 19 1999
TECHNOLOGY CENTER 3700

Respectfully submitted,

GROUP 1700

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By

Clifford M. Davidson
Clifford M. Davidson

Reg. No. 32,728

RECEIVED

Davidson, Davidson & Kappel, LLC
1140 Avenue of the Americas, 15th Floor
New York, New York 10036
(212) 997-1028

MAR 24 1999

**MATRIX-CUSTOMER
SERVICE CENTER**

I hereby certify that the documents referred to as attached therein and/or fee are being deposited with the United States Postal Service as "first class mail" in an envelope addressed to "Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231" on November 16, 1998.

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By

Jaqueline Perera

(Translation)



PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: November 10, 1997

Application Number: Japanese Patent Application
No. 307721/1997

Applicant(s): Director-General of
Agency of Industrial Science and Technology

RECEIVED

JAN 19 1999

GROUP 1700

RECEIVED

MAR 24 1999

ADMINISTRATIVE
SERVICE CENTER

August 7, 1998

Commissioner,
Patent Office

Takeshi Isayama (seal)

Certificate No. 10-3063035



日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1997年11月10日

出願番号
Application Number:

平成 9年特許願第307721号

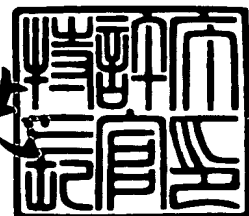
出願人
Applicant (s):

工業技術院長

1998年 8月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3063035

【書類名】 特許願

【整理番号】 11902177

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成 9年11月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K
A61K

【発明の名称】 糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質、その製造方法およびそれを含有する医薬組成物

【請求項の数】 15

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 今村 亨

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 浅田 眞弘

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 岡 修一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 鈴木 理

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前24-18-B201

【氏名】 米田 敦子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市梅園2-18-33 紫峰レジデンスM
2-3

【氏名】 大田 恵子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市二の宮1-12-17-203

【氏名】 織田 裕子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前17-12 沼尻アパート202

【氏名】 宮川 和子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東新井22-10 大山ハイツ205

【氏名】 折笠 訓子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工
業技術研究所内

【氏名】 浅田 知栄

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区折戸町5-16

【氏名】 小嶋 哲人

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【氏名又は名称】 工業技術院生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質、その製造方法およびそれを含有する医薬組成物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質。

【請求項2】 糖鎖が、硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖、O-型糖鎖、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される請求項1記載のヘパリン結合性タンパク質。

【請求項3】 ヘパリン結合性タンパク質がFGFファミリーに属する因子またはその近縁の因子である請求項1または2に記載のヘパリン結合性タンパク質。

【請求項4】 糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖が共有結合している請求項1記載のヘパリン結合性タンパク質。

【請求項5】 糖鎖を共有結合させるヘパリン結合性タンパク質が、以下の(a)または(b)のいずれかのタンパク質である請求項4記載のヘパリン結合性タンパク質。

(a) 配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは修飾されたアミノ酸配列からなり、FGF活性を有し、かつ糖鎖の付加を受けることができるタンパク質

【請求項6】 ヘパリン結合性タンパク質の2次構造においてターンを形成している部位又は末端近傍に糖鎖が結合しているか、あるいは、糖鎖付加によって3次元構造が大きく変化しない部位に糖鎖が結合している請求項1記載のヘパリン結合性タンパク質。

【請求項7】 糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、以下の工程：

(a) 糖鎖の付加を受けることができるペプチドをコードするcDNAとヘパリン結合性タンパク質をコードするcDNAとを連結する工程、

(b) 当該連結cDNAを発現ベクターに組み込む工程、

(c) 当該発現ベクターを糖鎖付加経路を有する宿主細胞に導入する工程、および

(d) 当該宿主細胞において、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖が共有結合しているヘパリン結合性タンパク質を発現させる工程を含む前記の方法。

【請求項8】 糖鎖が硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンであり、糖鎖の付加を受けることができるペプチドがプロテオグリカンコアタンパク質またはその一部分である請求項7記載の方法。

【請求項9】 糖鎖がN-型糖鎖であり、糖鎖の付加を受けることができるペプチドがN-型糖鎖付加アミノ酸配列を含むペプチドである請求項7記載の方法。

【請求項10】 糖鎖がO-型糖鎖であり、糖鎖の付加を受けることができるペプチドがO-型糖鎖付加アミノ酸配列を含むペプチドである請求項7記載の方法。

【請求項11】 糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、糖鎖を化学的結合法によりヘパリン結合性タンパク質に結合させる工程を含む前記の方法。

【請求項12】 糖鎖が、硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖、O-型糖鎖、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される請求項11記載の方法。

【請求項13】 ヘパリン結合性タンパク質がFGFファミリーに属する因子またはその近縁の因子である請求項7～12いずれかに記載の製造方法。

【請求項14】 請求項1～6のいずれかに記載のヘパリン結合性タンパク質を有効成分として含有する医薬組成物。

【請求項15】 糖鎖を持たない天然のタンパク質に糖鎖を共有結合させることにより、タンパク質を高機能化する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質、その製造方法およびそれを含有する医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、ヘパリン結合性タンパク質、なかでも繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor、以下、「FGF」と記す。) ファミリーに分類されるタンパク質及びその類似体 (fibroblast growth factor homologous factors) は、硫酸化多糖であるヘパリンとヘパラン硫酸に非共有的な結合様式で強く結合することが知られていた。そして繊維芽細胞増殖因子などのヘパリン結合性タンパク質をヘパリンなど硫酸化多糖との混合物とした場合、ヘパリン結合性タンパク質の生物活性や物性が変化し、その機能が変化し、高機能化する場合のあることが知られていた。しかしながら、硫酸化多糖を混合しても、期待できる高機能化は限定的なものであった。また、これらを医薬組成物として用いる場合には、遊離状態の硫酸化多糖による好ましくない生理活性が問題となっていた。ヘパリン結合性タンパク質の高機能化を意図してヘパリン結合性タンパク質と硫酸化多糖を共有結合によって一体化したタンパク質はこれまで存在しなかった。

【0003】

また、従来、ヘパリン結合性タンパク質、なかでもFGFファミリーに分類されるタンパク質及びその類似体の機能に対し、アスパラギン結合型糖鎖 (以下、「N-型糖鎖」という。) またはセリン・スレオニン結合型糖鎖 (以下、「O-型糖鎖」という。) の人工的な共有結合的一体化によってヘパリン結合性タンパク質の機能が高機能化出来ることは一切知られていなかった。さらにN-型糖鎖またはO-型糖鎖が与える一般的な影響については知られていなかった。例外として、FGF-6 について、本来それが有するN-型糖鎖の役割が生体外翻訳の系で示唆されたが、直接証明されてはいなかった。これまでに、ヘパリン結合性タンパク質の高機能化を意図してヘパリン結合性タンパク質とN-型糖鎖またはO-型糖鎖を共有結

合によって一体化した例は存在しなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、ヘパリン結合性タンパク質の機能改質をめざし、糖鎖を共有結合させたヘパリン結合性タンパク質とその製造方法を確立し、これを含む医薬組成物を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖及びO-型糖鎖の各々が動物生体中では糖タンパク質の糖鎖として合成されることに着目し、これらの糖鎖のいずれかの付加を受けることができるペプチドをコードするcDNAとヘパリン結合性タンパク質のcDNAを連結し、この連結cDNAの遺伝子産物を動物細胞に生産させることにより、共有結合によって結合している硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖又はO-型糖鎖を分子内に有するヘパリン結合性タンパク質を製造できることを見出し、さらに、これらの糖鎖が付加したヘパリン結合性タンパク質の機能が向上していることを確認した。本発明はこのような知見に基づいて完成されたものである。

【0006】

すなわち、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質を提供する。糖鎖は、硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖、O-型糖鎖、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されてもよい。ヘパリン結合性タンパク質はFGFファミリーに属する因子またはその近縁の因子であってもよい。ヘパリン結合性タンパク質は、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖を共有結合していてもよい。例えば、糖鎖を共有結合させるヘパリン結合性タンパク質は、以下の(a)または(b)のいずれかのタンパク質であってもよい。

【0007】

(a) 配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 1、3、5、17、19、21、23、25、27 または 29 のいずれかのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは修飾されたアミノ酸配列からなり、FGF 活性を有し、かつ糖鎖の付加を受けることができるタンパク質。

【0008】

本発明のヘパリン結合性タンパク質においては、ヘパリン結合性タンパク質の 2 次構造においてターンを形成している部位又は末端近傍に糖鎖が結合しているか、あるいは、糖鎖付加によって 3 次元構造が大きく変化しない部位に糖鎖が結合しているとよい。

【0009】

また、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、以下の工程：

(a) 糖鎖の付加を受けることができるペプチドをコードする cDNA とヘパリン結合性タンパク質をコードする cDNA とを連結する工程、

(b) 当該連結 cDNA を発現ベクターに組み込む工程、

(c) 当該発現ベクターを糖鎖付加経路を有する宿主細胞に導入する工程、および

(d) 当該宿主細胞において、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖が共有結合しているヘパリン結合性タンパク質を発現させる工程

を含むことを特徴とする前記の方法を提供する。糖鎖が硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンである場合には、糖鎖の付加を受けることができるペプチドはプロテオグリカンコアタンパク質またはその一部分であるとよい。糖鎖が N-型糖鎖である場合には、糖鎖の付加を受けることができるペプチドが N-型糖鎖付加アミノ酸配列を含むペプチドであるとよい。糖鎖が O-型糖鎖である場合には、糖鎖の付加を受けることができるペプチドが O-型糖鎖付加アミノ酸配列を含むペプチドであるとよい。また、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、糖鎖を化学的結合法によりヘパリン結合性タンパク質に結合させる工程を含む前記の方法を提供する。糖鎖は、硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖、O-型糖鎖、およびそれらの組

み合わせからなる群より選択されてもよく、ヘパリン結合性タンパク質はFGFファミリーに属する因子またはその近縁の因子であってもよい。さらに、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。さらにまた、本発明は、糖鎖を持たない天然のタンパク質に糖鎖を共有結合させることにより、タンパク質を高機能化する方法も提供する。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明において、糖鎖を共有結合させるべきヘパリン結合性タンパク質は、ヘパリン結合性を有するタンパク質であり、具体例としては、FGFファミリーに属する因子または近縁の因子、またはヘパリン結合性を有するが前者と構造的な類似性はない他のタンパク質を挙げることができる。ここで述べる他のタンパク質としては、具体的には、ヘパリン結合性上皮細胞増殖因子様因子(HB-EGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)などが挙げられるが、これに限定されるものではない。FGFファミリーに属する因子または近縁の因子の具体例としては、FGF-1~10や、FHF(fibroblast growth factor homologous factor)-1~4などが知られている。ヘパリン結合性タンパク質は、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖を共有結合していてもよい。例えば、糖鎖を共有結合させるヘパリン結合性タンパク質は、以下の(a)または(b)のいずれかのタンパク質であってもよい。

【0011】

(a) 配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは修飾されたアミノ酸配列からなり、FGF活性を有し、かつ糖鎖の付加を受けることができるタンパク質。

【0012】

配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27および29のアミノ酸配列を有するタンパク質は、例えば、配列番号2、4、6、18、20、22、24、26、28および30のDNA配列によりそれぞれコードされる。これらのタンパク質は、FGFファミリーに属する因子のペプチド配列の他、糖鎖の付加を受けることができるペプチド配列とシグナルペプチドの配列を含んでいる。本明細書でいうヘパリン結合性タンパク質は、配列表に記載されたcDNAが一次的に規定するタンパク質に加えて、細胞から分泌される際にそのアミノ末端に存するシグナルペプチドと呼ばれる分泌の為のペプチド配列が切断された形のタンパク質を含む。本発明の医薬組成物の有効成分として含有させるヘパリン結合性タンパク質は、初めからシグナルペプチドを欠損する形で製造してもその有用性には変化がない。

【0013】

ヘパリン結合性タンパク質に共有結合させる糖鎖は、共有結合させることによりヘパリン結合性タンパク質が高機能化されるものであれば、いかなるものであってもよく、ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸などの硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖、およびO-型糖鎖を例示することができるが、これらに限定されることはない。本明細書において、「高機能化」とは、対象のタンパク質の活性が上がることを意味する。高機能化の例として、糖鎖をタンパク質に共有結合させることにより、熱、酸またはアルカリによる処理の後に残っている活性が、糖鎖を共有結合させていないタンパク質に比べて、高くなることが挙げられる。本明細書でいう硫酸化多糖とは、タンパク質の一次構造に存するセリン残基に結合したキシロースを起点として伸長する、もしくは後述のN-型糖鎖やO-型糖鎖の非還元末端側に伸長する、あるいは遊離状態で存在する多様な糖鎖構造を総称するものであり、その多くはアミノ糖とウロン酸（またはガラクトース）の二糖単位の繰り返し構造をもち、いくつかの水酸基あるいはアミノ基が硫酸基で置換されているものをいう。また、グリコサミノグリカンとは、同様の構造を有するものであるが、硫酸基での置換がないものも含む。本明細書では、これらを総称して、硫酸化多糖等と記す。具体的な構造は、「糖鎖の細胞における運命」（

永井・箱守・木幡編、講談社サイエンティフィック）などに記載されており、代表的な糖鎖配列を図1に示す。本明細書でいうN-型糖鎖とは、タンパク質の一次構造に存するアスパラギン残基に結合したN-アセチルグルコサミンを起点として伸長する多様な糖鎖構造を総称するものである。具体的な構造は、「糖鎖の細胞における運命」（永井・箱守・木幡編、講談社サイエンティフィック）などに記載されており、代表的な糖鎖配列を図2に示す。本明細書でいうO-型糖鎖とは、タンパク質の一次構造に存するセリン残基またはスレオニン残基に結合したN-アセチルガラクトサミンを起点として伸長する多様な糖鎖構造を総称するものである。具体的な構造は、「糖鎖の細胞における運命」（永井・箱守・木幡編、講談社サイエンティフィック）などに記載されており、代表的な糖鎖配列を図3に示す。これらの硫酸化多糖等、N-型糖鎖およびO-型糖鎖は、その機能を発揮する限りにおいて、その糖鎖配列の一部に、付加、欠失、置換または修飾があってもよい。

【0014】

糖鎖をヘパリン結合性タンパク質に結合させるにあたっては、糖鎖のみを直接ヘパリン結合性タンパク質に共有結合させてもよいし、糖鎖を共有結合している任意の長さのペプチド鎖をヘパリン結合性タンパク質に共有結合させてもよい。

本発明の糖鎖が共有結合しているヘパリン結合性タンパク質（以下、「糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質」と記す。）を製造するには、まず、糖鎖の付加を受けることができるペプチドをコードするcDNAとヘパリン結合性タンパク質をコードするcDNAとを連結し、これを適切な発現ベクターに組み込み、当該発現ベクターを糖鎖付加経路を有する宿主細胞に導入して、糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させればよい。

【0015】

各種ヘパリン結合性タンパク質のcDNAは、DDBJ（日本DNAデータバンク）など遺伝子バンクに登録された配列から適当なプライマーを設計し、当該動物の当該組織のmRNAよりRT-PCR（逆転写PCR）を行うことによって、取得できる。

硫酸化多糖等付加型ヘパリン結合性タンパク質を製造するには、まず、ヘパリン結合性タンパク質のcDNAを硫酸化多糖等の付加を受けることが知られているペ

プチドをコードするcDNAと連結し、これを適切な宿主細胞発現ベクターに組み込み、当該ベクターを宿主細胞に導入して、硫酸化多糖等付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させればよい。硫酸化多糖等の付加を受けることが知られているペプチドとしては、各種プロテオグリカン（例えば、シンデカン、グリピカン、パールカンなど）のコアタンパク質またはその一部分が挙げられる。プロテオグリカンのコアタンパク質の一部分としては、プロテオグリカンの糖鎖付加部位と考えられるSer-Glyの繰り返し配列を含むペプチドが挙げられる。

【0016】

N-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を製造するには、まず、ヘパリン結合性タンパク質のcDNAをN-型糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドをコードするcDNAとライゲートし、これを適切な宿主細胞発現ベクターに組み込む。さらに当該ベクターを宿主細胞に導入し、N-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させればよい。N-型糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドの例として、Asn-X-Thr、Asn-X-Ser（配列中、X はプロリン以外の任意のアミノ酸である。）が挙げられる。

【0017】

O-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を製造するには、まず、ヘパリン結合性タンパク質のcDNAをO-型糖鎖の付加を受けることが既知であるペプチドをコードするcDNAとライゲートし、これを適切な宿主細胞発現ベクターに組み込む。さらに当該ベクターを宿主細胞に導入し、O-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させる。O-型糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドの例として、Ala-Thr-Pro-Ala-Proが挙げられる。

本発明で糖鎖を結合させる部位としては、ヘパリン結合性タンパク質の2次構造においてターンを形成している部位又は末端近傍や糖鎖付加によって3次元構造が大きく変化しない部位がよい。

本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質の製造方法の一例を以下に説明する。

【0018】

まず、分泌シグナルおよび糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドを

コードするオリゴヌクレオチドを合成し、あるいは PCR 反応によって増幅し、これをヘパリン結合性タンパク質をコードするプラスミドの5' 端に組み込む。

分泌シグナルおよび糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドとしては、例えば、典型的な分泌型糖タンパク質のアミノ末端を利用することができ、具体的には、マウス FGF-6 の N 末端より 40 残基のアミノ酸などが挙げられる。

ヘパリン結合性タンパク質をコードするプラスミドは、ヘパリン結合性タンパク質をコードする DNA を適当なプラスミドに組み込むことにより調製することができる。このヘパリン結合性タンパク質をコードする DNA を組み込むプラスミドとしては、宿主内で複製保持されるものであれば、いずれも使用することができるが、例えば大腸菌由来の pBR322、pUC18、及びこれらを基に構築された pET-3c などを挙げるができる。

【0019】

ヘパリン結合性タンパク質をコードするプラスミドに上記のオリゴヌクレオチドを組み込む方法としては、例えば T. Maniatis ら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 239 (1982) に記載の方法などが挙げられる。

上記のようにして作製したプラスミドから、分泌シグナル、糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドおよびヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を含む領域（以下、「糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を含む領域」と記す。）を切り出し、これを発現に適したベクター中のプロモーターの下流に連結することにより、発現型ベクターを得ることができる。

【0020】

上記の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を含む領域はその5' 末端に翻訳開始コドンとしての ATG を有し、また3' 末端には翻訳終始コドンとしての TAA、TGA または TAG を有してもよい。さらに該コーディング領域にコードされているタンパク質を発現させるにはその上流にプロモーターを接続する。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する宿主が枯草菌である場合には、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモ-

ターなど、宿主が酵母である場合には、PH05プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーターなどが挙げられる。また、宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーターが挙げられる。

【0021】

このようにして構築された糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を有する組み換えDNAを組み込むプラスミドとしては、宿主細胞内で発現されるものであれば、いずれも使用することができるが、例えば大腸菌由来のpBR322、pUC18などを基に構築されたベクターなどを挙げることもできる。

プラスミドに組み込む方法としては、例えばT.Maniatisら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 239 (1982)に記載の方法などが挙げられる。

上記の組み換えDNAを含むベクターを宿主細胞に導入することにより、該ベクターを保持する形質転換体を製造する。

【0022】

宿主細胞としては、糖鎖付加経路を有するものであれば、いかなるものであってもよく、枯草菌（例えばBacillus subtilis DB105）、酵母（例えばPichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae）、動物細胞（例えばCOS cell, CHO cell, BHK cell, NIH3T3 cell, BALB/c3T3 cell, HUVE cell, LEII cell）、昆虫細胞（例えば、Sf-9 cell、Tn cell）などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

【0023】

上記の形質転換は、それぞれの宿主について一般的に行われている方法で行う。また、一般的でなくとも適用可能な方法ならばよい。例としては、宿主が酵母であればリチウム法その他の方法により作成したコンピータント細胞に組み換えDNAを含むベクターを温度ショック法あるいはエレクトロポレーション法により導入する。宿主が動物細胞であれば、増殖期等の細胞に組み換えDNAを含むベクターをリン酸カルシウム法、リポフェクション法あるいはエレクトロポレーション法により導入する。

【0024】

このようにして得られた形質転換体を培地にて培養することにより、糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を産生させる。形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては、それぞれの宿主について一般的に用いられているものを用いる。または一般的でなくとも適用可能な培地ならば良い。例としては、宿主が酵母であればYPD培地などを用いる。宿主が動物細胞であれば、Dulbecco's MEMに動物血清を加えたものなどを用いる。培養は、それぞれの宿主について一般的に用いられている条件で行う。また一般的でなくとも適用可能な条件ならばよい。例としては、宿主が酵母であれば約25~37℃で、約12時間~2週間行い、必要により通気や攪拌を加えることができる。宿主が動物細胞であれば約32~37℃で、5% CO₂、100%湿度の条件で約24時間~2週間行い、必要により気相の条件を変えたり攪拌を加えることができる。

【0025】

上記のような形質転換体の培養物から糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を得るには、培養液中に放出されたものを、遠心分離後の上澄み液から直接回収できる。また、培養菌体あるいは細胞から抽出する場合には、培養後、ホモジェナイザー、フレンチプレス、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解によって菌体あるいは細胞を破壊することにより菌体外に目的のタンパク質を溶出させ、可溶性の画分から該タンパク質を得ることができる。また目的のタンパク質が不溶性画分に含まれる場合は菌体あるいは細胞を破壊後、遠心分離により不溶性画分を回収し、塩酸グアニジンなどを含む緩衝液などによって可溶性にして回収する方法も用いる。このほか塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤を含む緩衝液によって直接菌体あるいは細胞を破壊し、菌体外に目的のタンパク質を溶出させる方法もある。

【0026】

上記上澄み液から糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を精製するには、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析、溶媒沈殿、透析、限外濾過、ゲル濾過、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーク

ロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、等電点電気泳動などが使用されうる。さらに、多くのヘパリン結合性タンパク質については、ヘパリンセファロースを担体としたアフィニティークロマトグラフィー法が適用できる。

【0027】

このようにして得られた標品は糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質の活性が損なわれない限りにおいて透析、凍結乾燥を行い、乾燥粉末とすることもできる。さらに、担体として血清アルブミンなどを添加して保存することは、標品の容器への吸着を防ぐのに有効である。

また、精製過程、あるいは保存過程での微量の還元剤の共存は、該標品の酸化を防ぐのに好適である。還元剤としては、 β -メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、グルタチンなどが挙げられる。

【0028】

本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、化学的な方法で糖鎖をヘパリン結合性タンパク質に結合させることにより、製造することもできる。その具体的な方法としては以下のa)、b)いずれか、あるいはこれらの組み合わせによる方法が考えられる。

a) 例えば、まず、これらの糖鎖を生物学的方法または化学的合成法またはこれの適宜組み合わせた方法により完成させる。その際、糖鎖末端に適当なタンパク質結合用の残基を導入しておくこともできる。例えば、完成された糖鎖の還元末端を還元および部分酸化することによりアルデヒド基を形成し、これをタンパク質中のアミノ基とアミノ結合させることにより、糖鎖とタンパク質の結合が完成する。

【0029】

b) 例えば、まず、単糖の還元末端、あるいは単糖に結合した適当なタンパク質結合用の残基を還元および部分酸化することによりアルデヒド基を形成し、これをタンパク質中のアミノ基とアミノ結合させることにより、単糖とタンパク質の結合が完成する。この単糖の水酸基などの官能基にさらなる単糖や糖鎖などを結合させることにより、糖鎖を完成させる。この結合には生物学的方法または化学的合成法またはこれの適宜組み合わせた方法などが考えられる。

【0030】

ヘパリン結合性タンパク質に糖鎖を共有結合させることにより高機能化したタンパク質は医薬として利用可能である。例えば、本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、FGFの生理的機能を調節する作用を有する。FGFの生理的機能とは、具体的には、繊維芽細胞、血管内皮細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、グリア細胞の増殖を促進または抑制することという。従って、本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、細胞増殖や肝臓など組織再生の促進、創傷治癒や神経機能調節、および繊維芽細胞等の増殖調節に有効であり、各種疾病、具体的には、繊維芽細胞腫、血管腫、骨芽腫、神経細胞死、アルツハイマー病、パーキンソン病、神経芽腫、健忘症、痴呆病、心筋梗塞の予防や治療に有用であり、発毛剤、育毛剤などとしても利用可能である。

【0031】

上記のようにして得られた糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、医薬的に許容できる溶剤、賦形剤、担体、補助剤などを使用し、製剤製造の常法に従って液剤、ローション剤、エアゾール剤、注射剤、散剤、顆粒剤、錠剤、坐剤、腸溶剤およびカプセル剤などの医薬組成物としてもよい。

医薬組成物中、有効成分である糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質の含有量は、0.0000000001~1.0重量%程度とすればよい。

【0032】

該医薬組成物は、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ等の哺乳動物に対して非経口的にまたは経口的に安全に投与することができる。本医薬組成物の投与量は、剤形、投与ルート、症状等により適宜変更しうるが、例えばヒトを含む哺乳動物に投与する場合、当該糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を、0.0001~100mgを患部に1日に数回適用することが例示される。

以上、ヘパリン結合性タンパク質を例にとり本発明を説明したが、糖鎖を共有結合させることにより、ヘパリン結合性タンパク質以外の糖鎖を持たない天然のタンパク質も高機能化させることができる。

【0033】

微生物の寄託

本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする遺伝子（配列番号 2、4、18、20、22、24、26、28 および 30 の DNA 配列をそれぞれ有する）を組み込んだプラスミドを含む大腸菌 DH5 α 株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号 FERM P-16412、FERM P-16408、FERM P-16411、FERM P-16415、FERM P-16413、FERM P-16414、FERM P-16407、FERM P-16409 および FERM P-16410 にて、平成 9 年 9 月 10 日に寄託されている。

【0034】

【実施例】

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

〔実施例 1〕

【0035】

1) S/FGF-1a-II プラスミドの構築

1. ヒトリユウドカン cDNA 断片の作成

phR7A8 は、ヒトリユウドカンの cDNA (PCR 産物) を pBluescript II (KS+) クローニングベクターの EcoR V 部位に挿入したプラスミドである。アセッション番号 D13292 に示される mRNA 配列のうち、7 番目から 2610 番目までを含む (B.B.R.C. Vol. 190, No. 3, p.814-822, 1993 を参照のこと)。

これを Pvu II で消化し、得られた 2,232 塩基対の DNA 断片を鋳型として PCR (Polymerase Chain Reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) を行った。プライマーとして # 109 (5'-TTG TCG ACC CAC CAT GGC CCC CGC CCG TCT-3') (配列番号 7) および、# 111 (5'-TTG ATA TCT AGA GGC ACC AAG GGA TG-3') (配列番号 8) を用いた。特異的に増幅された 276 塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR V および Sal I で二重切断した。得られた、268 塩基対のバンドを分離抽出し、以下に示す連結反応に用いた。

【0036】

2. FGF-1a/pBluescript II (KS+)

ヒト FGF-1 cDNA を鋳型とし、# 967 (5'-GCG TCG ACA GCG CTA ATT ACA AGA AGC CCA AAC TC-3') (配列番号 9) および # 630 (5'-CCG AAT TCG AAT TCT TTA

ATC AGA AGA GAC TGG-3') (配列番号 10) をプライマーとして PCR 反応を行った。特異的に増幅された 434塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR I および Sal I で二重切断した。得られた、422 塩基対のバンドを分離抽出し、これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pBluescript II (KS+) クローニングベクター (2934 塩基対) に挿入して、FGF-1a/pBluescript II (KS+) を得た。

FGF-1a/pBluescript II (KS+) を Aor51H I および Sal I で順次消化し、得られた 2626塩基対のバンドを分離抽出し、以下に示す連結反応に用いた。

【0037】

3. S/FGF-1a-II キメラ遺伝子の作成

ヒトリユウドカンの PCR 産物の EcoR V/Sal I 断片、及び FGF-1a/pBluescript II (KS+) の Aor51H I/Sal I 断片を DNA 連結反応に供し、S/FGF-1a-II/pBluescript II (KS+) ベクターを得た。さらにこれを、EcoR I および Sal I で二重切断し、得られた、678 塩基対のバンドを分離抽出した。これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pMEXneo 発現ベクター (5916塩基対) に挿入して、S/FGF-1a-II/pMEXneo を得た。この発現型ベクターは、配列番号 2 の塩基配列を含む。

【0038】

2) S/FGF-1a-II の発現

得られた S/FGF-1a-II/pMEXneo をリポフェクション法によって CHO-K1 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞 K1 亜株) に遺伝子導入し、ジェネティシン存在下で培養することによって遺伝子導入細胞を選択した。得られた細胞を培養皿ほぼいっぱいになるまで増やし、培地を無血清培地に交換することによって物質生産量を増大させた。2 日毎に培地を交換し、得られた馴化培地は低速遠心分離した後、その上清を 4℃ で保存した。

【0039】

3) N-FGF-6/1a-IV プラスミドの構築

1. マウス FGF-6 cDNA 断片の作成

マウス FGF-6 cDNA を鋳型とし、# 1048 (5'-GCG TCG ACC CAC CAT GTC CCG GGG AGC AGG ACG TGT TCA GGG CAC GCT GCA GGC TCT CGT CTT C-3') (配列番号 1

1) および # 968 (5'-GCG ATA TCC AGT AGC GTG CCG TTG GCG CG-3') (配列番号 12) をプライマーとして PCR 反応を行った。特異的に増幅された 138塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR V および Sal I で二重切断した。得られた、130 塩基対のバンドを分離抽出し、以下に示す連結反応に用いた。

【0040】

2. N-FGF-6/1a-IVキメラ遺伝子の作成

マウス FGF-6の PCR産物の EcoR V/Sal I 断片、及び FGF-1a/pBluescript II (KS+)の Aor51H I/Sal I 断片を DNA連結反応に供し、N-FGF-6/1a-IV/pBluescript II (KS+)ベクターを得た。さらにこれを、EcoR I および Sal I で二重切断し、得られた、540 塩基対のバンドを分離抽出した。これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pMEXneo発現ベクター (5916塩基対) に挿入して、N-FGF-6/1a-IV/pMEXneo を得た。この発現型ベクターは、配列番号 4 の塩基配列を含む。

【0041】

4) N-FGF-6/1a-IV の発現

上述、S/FGF-6/1a-IIと同様に N-FGF-6/1a-IV/pMEXneoを CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、N-FGF-6/1a-IV を培養上清中に分泌させた。

【0042】

5) O-FGF-6/1aプラスミドの構築

1. N-FGF-6/1a<NQ> キメラ遺伝子の作成

N-FGF-6/1a/pBluescript II (KS+) ベクターを鋳型とし、# 105 (5'-GCG TCG ACC CAC CAT GTC-3') (配列番号 13) および # 124 (5'-GCG ATA TCC AGT AGC GTG CCT TGG GCG CG-3') (配列番号 14) をプライマーとして PCR 反応を行った。特異的に増幅された 138塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR V および Sal I で二重切断した。得られた、130 塩基対のバンドを、FGF-1a/pBluescript II (KS+) の A r51H I/Sal I断片と共に DNA連結反応に供し、N-FGF-6/1a<NQ>/pBluescript II (KS+) ベクターを得た。

【0043】

2. O-FGF-6/1a キメラ遺伝子の作成

N-FGF-6/1a<NQ>/pBluescript II (KS+) を鋳型とし、# 098 (5'-GCT GGA GGA GGC TGC TAC TCC AGC TCC AAA CCA TTA CA-3') (配列番号 15) および、# 116 (5'-GCC GCT CTA GAA CTA GTG GAT-3') (配列番号 16) をプライマーとして一次 PCR 反応を行い、特異的に増幅された 210塩基対のバンドを精製し、この PCR 産物と # 115 (5'-AAC AAA AGC TGG GTA CCG GG-3') をプライマーとして二次 PCR 反応を行った。特異的に増幅された 631塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出、精製後、EcoR I および Sal I で二重切断した。得られた、558 塩基対のバンドを、分離抽出した。これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pMEXneo 発現ベクター (5916塩基対) に挿入して、O-FGF-6/1a/pMEXneo を得た。この発現型ベクターは、配列番号 6 の塩基配列を含む。

【0044】

6) O-FGF-6/1a の発現

上述の S/FGF-1a-II と同様に O-FGF-6/1a/pMEXneo を CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、O-FGF-6/1a を培養上清中に分泌させた。

【0045】

7) 大腸菌での FGF-1a の発現

上述のとおり得られたヒト FGF-1a cDNA の EcoR I, Sal I 二重切断断片を、大腸菌用発現ベクターである pET3c に組み込んだ。得られたベクターで大腸菌 BL21 (DE3)pLysS を形質転換した後、対数増殖期にある菌体を IPTG (イソプロピルチオ-β-ガラクトシド) で刺激することによって、導入遺伝子の発現を誘導した。この菌体を集め、超音波破碎することによって FGF-1a を遊離させ、遠心上清中にこれを回収した。

【0046】

8) ペプチド N-グリコシダーゼ F 処理による N-型糖鎖の除去

後述のとおり (試験例 1 参照) ヘパリンセファロースビーズで濃縮した N-FGF-6/1a-II を電気泳動用緩衝液で煮沸、溶出した。その一部に、NP-40 (終濃度 1%)、トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)、ペプチド N-グリコシダーゼ F (0.3 U) を加え、37℃で一晩保温した後、100℃で3分間加熱して酵素反応を止めた。これを後述のとおり SDS 変性電気泳動によって解析した。

【0047】

上記、実施例のうち、「1.ヒトリユウドカン cDNA断片の作成」や「1.マウスFGF-6cDNA断片の作成」で述べたPCRプライマー（#111, #968）を適当な配列に変更し、さらに酵素処理に用いるEcoR Vを平滑末端を生じる適当な制限酵素に変更することによって、様々のS/FGF-1a、N-FGF-6/1aを作成することができる。このようなcDNA配列の例を配列番号8, 20, 22, 24, 26, 28に示す。

また、上記、実施例のうち、「2.0-FGF-6/1aキメラ遺伝子の作成」で述べたPCRに用いる鋳型をS/FGF-1a-II/pBluescript II(KS+) やN-FGF-6/1a-IV/pBluescript II(KS+) などを用いることによって、あるいはPCRプライマー（#098, #116, #115）を適当な配列に変更することによって、あるいはその両方を組み合わせることによって、様々の0-FGF-6/1aを作成することができる。このようなcDNA配列の例を配列番号30に示す。

【0048】

〔試験例1〕 SDS 変性電気泳動

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地に加えたヘパリンセファローズビーズを洗浄後、直接、電気泳動用緩衝液（SDS, 2-メルカプトエタノール含有）と共に煮沸し、溶出された蛋白質を試料とした。12.5 %アクリルアミドゲルを用い、SDS、2-メルカプトエタノール存在下で電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に電氣的に転写後、抗 FGF-1単クローナル抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG抗体を用いて染色し、化学発光法で検出した（図4）。図中、左の矢は分子量既知の標準タンパク質の泳動位置とその分子量（単位：ダルトン）を示す。図中、A)はS/FGF-1a-II のSDS変性電気泳動図を、B)は、大腸菌で生産したFGF-1a（レーンa）、N-FGF-6/1a-IV をペプチドN-グリコシダーゼ Fで処理することによりN-型糖鎖を除去したN-FGF-1a-IV（レーンb）、N-FGF-6/1a-IV（レーンc）および0-FGF-6/1a（レーンd）のSDS変性電気泳動図を示す。

【0049】

〔試験例2〕 DNA 合成促進活性

HUVEC（ヒト臍帯由来血管内皮細胞）は15 % 血清存在下でもFGFなどの増

殖因子が欠乏すると細胞周期が停止する。このような状態においた HUVECに S/FGF-1a-II, N-FGF-6/1a-IV, O-FGF-6/1a あるいは大腸菌で生産させた FGF-1a を添加し、18時間後、放射標識されたチミジンを6時間取り込ませてこの間にDNA中に取り込まれた放射能によって新たに合成された DNA量とした。

【0050】

1. S/FGF-1a-IIのヒト血管内皮細胞へのDNA合成促進効果（ヘパリン非依存性）

S/FGF-1a-II 遺伝子導入細胞の無血清培地での馴化培地を PBSに対して透析後、ヘパリン共存下（5 $\mu\text{g/ml}$ ）、あるいはヘパリン非共存下で、HUVEC の DNA合成促進活性を調べた。その結果、S/FGF-1a-II は、大腸菌で生産した FGF-1a とは異なり、ヘパリン非依存的に HUVECの DNA合成を促進した（図5）。

【0051】

2. N-FGF-6/1a-IVのヒト血管内皮細胞への DNA合成促進効果

N-FGF-6/1a-IV 遺伝子導入細胞の無血清培地での馴化培地を PBSに対して透析後、ヘパリン共存下（5 $\mu\text{g/ml}$ ）、あるいはヘパリン非共存下で、HUVEC の DNA合成促進活性を調べた（図8）。その結果、N-FGF-6/1a-IV は、大腸菌で生産した FGF-1a と同様に HUVECの DNA合成を促進するものの、そのヘパリン依存性は弱く、ヘパリン非共存下では大腸菌由来FGF-1aよりも強いDNA 合成促進活性を示した（図8）。

【0052】

〔試験例3〕 ヘパリン親和性アフィニティークロマトグラフィー

前述2）で得られたS/FGF-1a-II について、ヘパリン親和性を調べた。S/FGF-1a-II の分泌細胞の馴化培地にヘパリンセファロースビーズを加え、4℃で2時間以上攪拌した。低速遠心によって沈降するビーズを回収し、生理的リン酸緩衝液（PBS：phosphate buffered saline, pH 7.4）で十分に洗浄後、2.5 M NaClを含む PBSによってヘパリン固定化ビーズに結合した蛋白質を溶出した。さらにこの溶出液に蒸留水を加え塩濃度を低下させた後、再び、ヘパリン親和性アフィニティークロマトグラフィーに供し、NaClの濃度勾配によってS/FGF-1a-II を溶出した。

大腸菌由来FGF-1aは約1.0 M NaCl付近に溶出されるのに対し、S/FGF-1a-II は

約0.4 M NaClで溶出され、固定化ヘパリンへの親和性が低下しているものと考えられた(図9)。図9で見られる1.0 M NaCl付近の小さなピークについては、SDS変性電気泳動の結果、S/FGF-1a-IIの分解産物と考えられる。

【0053】

〔試験例4〕 FGF-1a 類似蛋白質の耐熱安定性

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地を PBSに対して十分に透析し、その一部を 56℃または 70℃に保温した PBS中に 30 分間保持、あるいは、室温で12時間保持した後、再び 4℃の PBSに対して透析し、試料とした。S/FGF-1a-IIの安定性は、各種処理の後、HUVEC のDNA 合成促進活性試験に供し、4℃の PBS で12時間透析した試料との比較によって、安定性の指標とした。

室温、12時間では、大腸菌由来 FGF-1a でもヘパリンによってその活性は保護されるが、S/FGF-1a-II はヘパリンの有無に関わらず活性は保持された。

また、56℃、30分の熱処理では大腸菌由来 FGF-1a はほとんど失活するにも関わらず、S/FGF-1a-II は約 50 % の活性が残存し、耐熱安定性が向上しているものと考えられた(図6)。

【0054】

〔試験例5〕 FGF-1a 類似蛋白質の耐酸、耐アルカリ安定性

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地を PBSに対して十分に透析し、その一部を pH 4.0 のクエン酸緩衝液または pH 10.0の炭酸ナトリウム緩衝液中で12時間透析し、再び 4℃の PBSに対して透析した後、試料とした。S/FGF-1a-Iの安定性は、各種処理の後、HUVEC のDNA 合成促進活性試験に供し、4℃の PBS で12時間透析した試料との比較によって、安定性の指標とした。

S/FGF-1a-II はヘパリンの存在の有無に関わらず pH 4.0 の酸処理によってもほとんど活性の低下がみられず、耐酸安定性の向上が認められた(図6)。また、pH 10.0 のアルカリ処理によって、大腸菌由来 FGF-1a がほとんど活性を消失するにも関わらず、S/FGF-1a-II は約50%の活性を保持しており、耐アルカリ安定性についても向上が認められた(図6)。

【0055】

〔試験例6〕 FGF-1a 類似蛋白質の抗蛋白質分解酵素安定性

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地をPBSに対して十分に透析し、その一部に各種濃度のトリプシン液 (0.0001~0.1%) を加え、37℃で1時間保温した。これを前述のSDS変性電気泳動に供し、残存するバンドの強度を処理前の試料と比較することで安定性の指標とした。

その結果、図7に示すとおり、S/FGF-1a-II は0.001%のトリプシン処理で88%、0.01%で35%の染色強度が残存するのに対し、大腸菌由来FGF-1aは0.001%で58%、0.01%で6%にまでバンドの強度が減少しており、S/FGF-1a-II は蛋白質分解酵素に対する抵抗性が増大しているものと考えられた (図7)。

【0056】

【発明の効果】

本発明の新規な糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、耐熱性、耐酸性、耐アルカリ性、蛋白質分解酵素抵抗性などの安定性に優れている。従って、本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を医薬品に利用することにより、生体内での安定性、特に、耐酸性、耐アルカリ性といった安定性に優れ、経口投与への適用が可能な医薬品を設計することができる。

【0057】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：221

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly

1 5 10 15

Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu

20 25 30

Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val

35 40 45

Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly
50 55 60
Asp Leu Asp Asp Leu Glu Asp Ser Met Ile Gly Pro Glu Val Val His
65 70 75 80
Pro Leu Val Pro Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr
85 90 95
Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val
100 105 110
Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser
115 120 125
Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln
130 135 140
Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro
145 150 155 160
Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn
165 170 175
Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu
180 185 190
Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln
195 200 205
Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
210 215 220

【0058】

配列番号：2

配列の長さ：663

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
 ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120
 GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAAGTGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
 TCTGGCTCTG GAGATCTGGA TGAATTGGAA GACTCCATGA TCGGCCCTGA AGTTGTCCAT 240
 CCCTTGGTGC CTCTAGATGC TAATTACAAG AAGCCCCAAC TCCTCTACTG TAGCAACGGG 300
 GGCCACTTCC TGAGGATCCT TCCGGATGGC ACAGTGGATG GGACAAGGGA CAGGAGCGAC 360
 CAGCACATTC AGCTGCAGCT CAGTGCGGAA AGCGTGGGGG AGGTGTATAT AAAGAGTACC 420
 GAGACTGGCC AGTACTTGGC CATGGACACC GACGGGCTTT TATACGGCTC ACAGACACCA 480
 AATGAGGAAT GTTTGTTCCT GGAAAGGCTG GAGGAGAACC ATTACAACAC CTATATATCC 540
 AAGAAGCATG CAGAGAAGAA TTGGTTTGTG GGCCTCAAGA AGAATGGGAG CTGCAAACGC 600
 GGTCTCGGA CTCACTATGG CCAGAAAGCA ATCTTGTTTC TCCCCCTGCC AGTCTCTTCT 660
 GAT 663

【0059】

配列番号：3

配列の長さ：175

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val
 5 10 15
 Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala
 20 25 30
 Arg Ala Asn Gly Thr Leu Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly
 50 55 60
 Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln

65	70	75	80
Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr			
	85	90	95
Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln			
	100	105	110
Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His			
	115	120	125
Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val			
	130	135	140
Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr			
	145	150	155
Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp			
	165	170	175

【0060】

配列番号：4

配列の長さ：525

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

```

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60
CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GGCGCCCGCG CCAACGGCAC GCTACTGGAC 120
GCTAATTACA AGAAGCCCAA ACTCCTCTAC TGTCAGCAACG GGGGCCACTT CCTGAGGATC 180
CTTCCGGATG GCACAGTGGA TGGGACAAGG GACAGGAGCG ACCAGCACAT TCAGCTGCAG 240
CTCAGTGCGG AAAGCGTGGG GGAGGTGTAT ATAAAGAGTA CCGAGACTGG CCAGTACTTG 300
GCCATGGACA CCGACGGGCT TTTATACGGC TCACAGACAC CAAATGAGGA ATGTTTGTTC 360
CTGGAAAGGC TGGAGGAGAA CCATTACAAC ACCTATATAT CCAAGAAGCA TGCAGAGAAG 420
AATTGGTTTG TTGGCCTCAA GAAGAATGGG AGCTGCAAAC GCGGTCCTCG GACTCACTAT 480

```

GGCCAGAAAG CAATCTTGTT TCTCCCCCTG CCAGTCTCTT CTGAT

525

【0061】

配列番号：5

配列の長さ：181

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val

5

10

15

Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala

20

25

30

Arg Ala Gln Gly Thr Leu Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu

35

40

45

Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly

50

55

60

Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln

65

70

75

80

Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr

85

90

95

Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln

100

105

110

Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Ala Ala

115

120

125

Thr Pro Ala Pro Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala

130

135

140

Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg

145

150

155

160

Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu

165

170

175

Pro Val Ser Ser Asp

180

【0062】

配列番号：6

配列の長さ：543

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60
CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GCGGCCCGCG CCCAAGGCAC GCTACTGGAC 120
GCTAATTACA AGAAGCCCAA ACTCCTCTAC TGTAGCAACG GGGGCCACTT CCTGAGGATC 180
CTTCCGGATG GCACAGTGGA TGGGACAAGG GACAGGAGCG ACCAGCACAT TCAGCTGCAG 240
CTCAGTGCGG AAAGCGTGGG GGAGGTGTAT ATAAAGAGTA CCGAGACTGG CCAGTACTTG 300
GCCATGGACA CCGACGGGCT TTTATACGGC TCACAGACAC CAAATGAGGA ATGTTTGTTT 360
CTGGAAAGGC TGGAGGAGGC TGCTACTCCA GCTCCAAACC ATTACAACAC CTATATATCC 420
AAGAAGCATG CAGAGAAGAA TTGGTTTGTT GGCCTCAAGA AGAATGGGAG CTGCAAACGC 480
GGTCCTCGGA CTCACTATGG CCAGAAAGCA ATCTTGTTTC TCCCCTGCC AGTCTCTTCT 540
GAT 543

【0063】

配列番号：7

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTGTCGACCC ACCATGGCCC CCGCCCGTCT

30

【0064】

配列番号：8

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

1列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTGATATCTA GAGGCACCAA GGGATG

26

【0065】

配列番号：9

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGTCGACAG CGCTAATTAC AAGAAGCCCA AACTC

35

【0066】

配列番号：10

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGAATTCGA ATTCTTTAAT CAGAAGAGAC TGG

33

【0067】

配列番号：11

配列の長さ：64

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGTCGACCC ACCATGTCCC GGGGAGCAGG ACGTGTTTCAG GGCACGCTGC AGGCTCTCGT 60
CTTC 64

【0068】

配列番号：12

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGATATCCA GTAGCGTGCC GTTGGCGCG 29

【0069】

配列番号：13

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGTCGACCC ACCATGTC 18

【0070】

配列番号：14

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGATATCCA GTAGCGTGCC TTGGGCGCG

29

【0071】

配列番号：15

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTGGAGGAG GCTGCTACTC CAGCTCCAAA CCATTACA

38

【0072】

配列番号：16

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCCGCTCTAG AACTAGTGGGA T

21

【0073】

配列番号：17

配列の長さ：200

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly

1 5 10 15

Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu

20 25 30

Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val

35 40 45

Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly

50 55 60

Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly

65 70 75 80

His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp

85 90 95

Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly

100 105 110

Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp

115 120 125

Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu

130 135 140

Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys

145 150 155 160

Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser

165 170 175

Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe

180 185 190

Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp

195

200

【0074】

配列番号：18

配列の長さ：600

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

```

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120
GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAAGTGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
TCTGGCTCTG GAGATGCTAA TTACAAGAAG CCCAACTCC TCTACTGTAG CAACGGGGGC 240
CACTTCCTGA GGATCCTTCC GGATGGCACA GTGGATGGGA CAAGGGACAG GAGCGACCAG 300
CACATTCAGC TGCAGCTCAG TCGGAAAGC GTGGGGGAGG TGTATATAAA GAGTACCGAG 360
ACTGGCCAGT ACTTGGCCAT GGACACCGAC GGGCTTTTAT ACGGCTCACA GACACCAAAT 420
GAGGAATGTT TGTTCTTGA AAGGCTGGAG GAGAACCATT ACAACACCTA TATATCCAAG 480
AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTTGGC CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT 540
CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT 600
    
```

【0075】

配列番号：19

配列の長さ：200

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly

5

10

15

【0076】

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

```

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG   60
ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA  120
GCCCTATCAG ACGATGAGGA TGTAGTGGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG  180
TCTGGCTCTG GAGATGCTAA TTACAAGAAG CCCAAACTCC TCTACTGTAG CAACGGGGGC  240
CACTTCCTGA GGATCCTTCC GGATGGCACA GTGGATGGGA CAAGGGACAG GAGCGACCAG  300
CACATTCAGC TGCAGCTCAG TGCGGAAAGC GTGGGGGAGG TGTATATAAA GAGTACCGAG  360
ACTGGCCAGT ACTTGGCCAT GGACACCGAC GGGCTTTTAT ACGGCTCACA GACACCAAAT  420
GAGGAATGTT TGTTCTGGA AAGGCTGGAG GAGAACCATT ACAACACCTA TATATCCAAG  480
AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTTGGC CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT  540
CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT  600
  
```

【0077】

配列番号：21

配列の長さ：254

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

```

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly
          5              10              15
Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu
          20              25              30
Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val
          35              40              45
Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly
          50              55              60
Asp Leu Asp Asp Leu Glu Asp Ser Met Ile Gly Pro Glu Val Val His
  
```


65	70	75	80
Pro Leu Val	Pro Leu Asp Asn His Ile	Pro Glu Arg Ala Gly	Ser Gly
	85	90	95
Ser Gln Val	Pro Thr Glu Pro Lys Lys Leu Glu Glu	Asn Glu Val	Ile
	100	105	110
Pro Lys Arg Ile Ser Pro Val Ala Asn Tyr Lys Lys	Pro Lys Leu Leu		
	115	120	125
Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr			
	130	135	140
Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu			
	145	150	155
Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly			
	165	170	175
Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr			
	180	185	190
Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr			
	195	200	205
Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly			
	210	215	220
Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly			
	225	230	235
Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp			
	245	250	

【0078】

配列番号：22

配列の長さ：762

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

```

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG   60
ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA  120
GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAAGTGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG  180
TCTGGCTCTG GAGATCTGGA TGAAGTGGAA GACTCCATGA TCGGCCCTGA AGTTGTCCAT  240
CCCTTGGTGC CTCTAGATAA CCATATCCCT GAGAGGGCAG GGTCTGGGAG CCAAGTCCCC  300
ACCGAACCCA AGAACTAGA GGAGAATGAG GTTATCCCCA AGAGAATCTC ACCCGTTGCT  360
AATTACAAGA AGCCCAAACCT CCTCTACTGT AGCAACGGGG GCCACTTCCT GAGGATCCTT  420
CCGGATGGCA CAGTGGATGG GACAAGGGAC AGGAGCGACC AGCACATTCA GCTGCAGCTC  480
AGTGCGGAAA GCGTGGGGGA GGTGTATATA AAGAGTACCG AACTGGCCA GTACTTGGCC  540
ATGGACACCG ACGGGCTTTT ATACGGCTCA CAGACACCAA ATGAGGAATG TTTGTTCTCTG  600
GAAAGGCTGG AGGAGAACCA TTACAACACC TATATATCCA AGAAGCATGC AGAGAAGAAT  660
TGGTTTGTG GCCTCAAGAA GAATGGGAGC TGCAAACGCG GTCCTCGGAC TCACTATGGC  720
CAGAAAGCAA TCTTGTTTCT CCCCTGCCA GTCTCTTCTG AT                               762

```

【0079】

配列番号 : 23

配列の長さ : 281

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

```

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly
          5              10              15
Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu
          20              25              30
Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val
          35              40              45
Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly

```

50	55	60
Asp Leu Asp Asp Leu Glu Asp Ser Met Ile Gly Pro Glu Val Val His		
65	70	75
Pro Leu Val Pro Leu Asp Asn His Ile Pro Glu Arg Ala Gly Ser Gly		
85	90	95
Ser Gln Val Pro Thr Glu Pro Lys Lys Leu Glu Glu Asn Glu Val Ile		
100	105	110
Pro Lys Arg Ile Ser Pro Val Glu Glu Ser Glu Asp Val Ser Asn Lys		
115	120	125
Val Ser Met Ser Ser Thr Val Gln Gly Ser Asn Ile Phe Glu Arg Thr		
130	135	140
Glu Val Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly		
145	150	155
Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg		
165	170	175
Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val		
180	185	190
Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met		
195	200	205
Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys		
210	215	220
Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser		
225	230	235
Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly		
245	250	255
Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu		
260	265	270
Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp		
275	280	

【0080】

配列番号：24

配列の長さ：843

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

```

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120
GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAAGTGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
TCTGGCTCTG GAGATCTGGA TGAAGTGAA GACTCCATGA TCGGCCCTGA AGTTGTCCAT 240
CCCTTGGTGC CTCTAGATAA CCATATCCCT GAGAGGGCAG GGTCTGGGAG CCAAGTCCCC 300
ACCGAACCCA AGAACTAGA GGAGAATGAG GTTATCCCCA AGAGAATCTC ACCCGTTGAA 360
GAGAGTGAGG ATGTGTCCAA CAAGGTGTCA ATGTCCAGCA CTGTGCAGGG CAGCAACATC 420
TTTGAGAGAA CGGAGGTCGC TAATTACAAG AAGCCCAAAC TCCTCTACTG TAGCAACGGG 480
GGCCACTTCC TGAGGATCCT TCCGGATGGC ACAGTGGATG GGACAAGGGA CAGGAGCGAC 540
CAGCACATTC AGCTGCAGCT CAGTGCGGAA AGCGTGGGGG AGGTGTATAT AAAGAGTACC 600
GAGACTGGCC AGTACTTGGC CATGGACACC GACGGGCTTT TATACGGCTC ACAGACACCA 660
AATGAGGAAT GTTTGTTCTT GGAAAGGCTG GAGGAGAACC ATTACAACAC CTATATATCC 720
AAGAAGCATG CAGAGAAGAA TTGGTTTGTT GGCCTCAAGA AGAATGGGAG CTGCAAACGC 780
GGTCCTCGGA CTCATATGG CCAGAAAGCA ATCTTGTTTC TCCCCCTGCC AGTCTCTTCT 840
GAT 843

```

【0081】

配列番号：25

配列の長さ：172

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met	Ser	Arg	Gly	Ala	Gly	Arg	Val	Gln	Gly	Thr	Leu	Gln	Ala	Leu	Val
				5					10					15	
Phe	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Gly	Met	Val	Val	Pro	Ser	Pro	Ala	Gly	Ala
				20					25					30	
Arg	Ala	Asn	Gly	Ser	Ala	Asn	Tyr	Lys	Lys	Pro	Lys	Leu	Leu	Tyr	Cys
				35					40					45	
Ser	Asn	Gly	Gly	His	Phe	Leu	Arg	Ile	Leu	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Asp
				50					55					60	
Gly	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Asp	Gln	His	Ile	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Ala
				65					70					75	
Glu	Ser	Val	Gly	Glu	Val	Tyr	Ile	Lys	Ser	Thr	Glu	Thr	Gly	Gln	Tyr
				85					90					95	
Leu	Ala	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr	Gly	Ser	Gln	Thr	Pro	Asn
				100					105					110	
Glu	Glu	Cys	Leu	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Glu	Asn	His	Tyr	Asn	Thr
				115					120					125	
Tyr	Ile	Ser	Lys	Lys	His	Ala	Glu	Lys	Asn	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Lys
				130					135					140	
Lys	Asn	Gly	Ser	Cys	Lys	Arg	Gly	Pro	Arg	Thr	His	Tyr	Gly	Gln	Lys
				145					150					155	
Ala	Ile	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Val	Ser	Ser	Asp				
				165										170	

【0082】

配列番号：26

配列の長さ：516

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60
 CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GGCGCCCGCG CCAACGGCTC GGCTAATTAC 120
 AAGAAGCCCA AACTCCTCTA CTGTAGCAAC GGGGGCCACT TCCTGAGGAT CCTTCCGGAT 180
 GGCACAGTGG ATGGGACAAG GGACAGGAGC GACCAGCACA TTCAGCTGCA GCTCAGTGCG 240
 GAAAGCGTGG GGGAGGTGTA TATAAAGAGT ACCGAGACTG GCCAGTACTT GGCCATGGAC 300
 ACCGACGGGC TTTTATACGG CTCACAGACA CCAAATGAGG AATGTTTGTT CCTGGAAAGG 360
 CTGGAGGAGA ACCATTACAA CACCTATATA TCCAAGAAGC ATGCAGAGAA GAATTGGTTT 420
 GTTGGCCTCA AGAAGAATGG GAGCTGCAAA CGCGGTCCTC GGACTCACTA TGGCCAGAAA 480
 GCAATCTTGT TTCTCCCCCT GCCAGTCTCT TCTGAT 516

【0083】

配列番号：27

配列の長さ：210

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val
 5 10 15
 Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala
 20 25 30
 Arg Ala Asn Gly Thr Leu Leu Asp Ser Arg Gly Trp Gly Thr Leu Leu
 35 40 45
 Ser Arg Ser Arg Ala Gly Leu Ala Gly Glu Ile Ser Gly Val Asn Trp
 50 55 60
 Glu Ser Gly Tyr Leu Val Gly Ile Lys Arg Gln Ala Asn Tyr Lys Lys
 65 70 75 80
 Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu

85	90	95
Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile		
100	105	110
Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser		
115	120	125
Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr		
130	135	140
Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu		
145	150	155
Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn		
165	170	175
Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg		
180	185	190
Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser		
195	200	205
Ser Asp		
210		

【0084】

配列番号：28

配列の長さ：630

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

```

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC   60
CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GGC GCCCGCG CCAACGGCAC GCTACTGGAC   120
TCCAGAGGCT GGGGCACCCT CTTGTCCAGG TCTCGAGCTG GGCTAGCTGG AGAGATTTCG   180
GGTGTGAATT GGGAAAGCGG CTATTTGGTG GGCATTAAGC GACAGGCTAA TTACAAGAAG   240

```

CCCAAACTCC TCTACTGTAG CAACGGGGGC CACTTCCTGA GGATCCTTCC GGATGGCACA 300
 GTGGATGGGA CAAGGGACAG GAGCGACCAG CACATTCAGC TGCAGCTCAG TGCGGAAAGC 360
 GTGGGGGAGG TGTATATAAA GAGTACCGAG ACTGGCCAGT ACTTGCCCAT GGACACCGAC 420
 GGGCTTTTAT ACGGCTCACA GACACCAAAT GAGGAATGTT TGTTCTTGA AAGGCTGGAG 480
 GAGAACCATT ACAACACCTA TATATCCAAG AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTTGGC 540
 CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC 600
 TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT 630

【0085】

配列番号：29

配列の長さ：180

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val

5

10

15

Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala

20

25

30

Arg Ala Asn Gly Thr Leu Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu

35

40

45

Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly

50

55

60

Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln

65

70

75

80

Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr

85

90

95

Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln

100

105

110

Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Ala

115 120 125
 Thr Pro Ala Pro His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu
 130 135 140
 Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly
 145 150 155 160
 Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro
 165 170 175
 Val Ser Ser Asp
 180

【0086】

配列番号：30

配列の長さ：540

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60
 CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GCGCGCCGCG CCAACGGCAC GCTACTGGAC 120
 GCTAATTACA AGAAGCCCAA ACTCCTCTAC TGTAACAACG GGGGCCACTT CCTGAGGATC 180
 CTTCCGGATG GCACAGTGGG TGGGACAAGG GACAGGAGCG ACCAGCACAT TCAGCTGCAG 240
 CTCAGTGGCG AAAGCGTGGG GGAGGTGTAT ATAAAGAGTA CCGAGACTGG CCAGTACTTG 300
 GCCATGGACA CCGACGGGCT TTTATACGGC TCACAGACAC CAAATGAGGA ATGTTTGTTT 360
 CTGGAAAGGC TGGAGGAGAA CGCTACTCCA GCTCCACATT ACAACACCTA TATATCCAAG 420
 AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTGGC CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT 480
 CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT 540

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、代表的な硫酸化多糖およびグリコサミノグリカン糖鎖の例を示す。

【図2】

図2は、代表的なN-型糖鎖の例を示す。

【図3】

図3は、代表的なO-型糖鎖の例を示す。

【図4】

図4は、各種FGF-1a類似タンパク質のSDS変性電気泳動図を示す。

【図5】

図5は、S/FGF-1a-II および大腸菌由来FGF-1aのHUVEC に対するDNA合成促進活性を示す。

【図6】

図6は、S/FGF-1a-II および大腸菌由来FGF-1aの耐熱安定性、耐酸安定性および耐アルカリ安定性を示す。

【図7】

図7は、S/FGF-1a-II および大腸菌由来FGF-1aのトリプシンに対する抵抗性を示す。

【図8】

図8は、N-FGF-6/1a-IVおよび大腸菌由来FGF-1aのHUVEC に対するDNA 合成促進活性を示す。

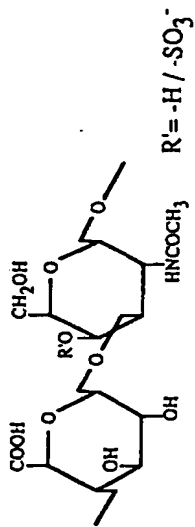
【図9】

図9は、S/FGF-1a-II のヘパリン親和性を示す。

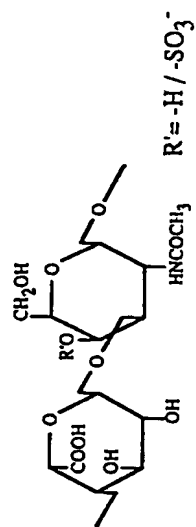
【書類名】 図面

【図1】

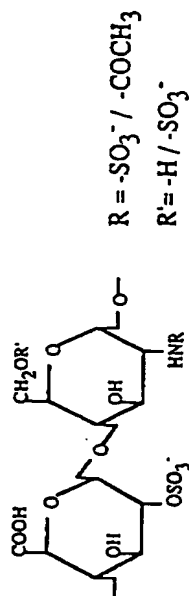
1) コンドロイチン硫酸 / (GlcA-GalN)n



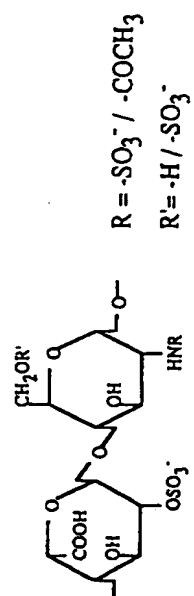
2) デルマタン硫酸 / (IdoA/GlcA-GalN)n



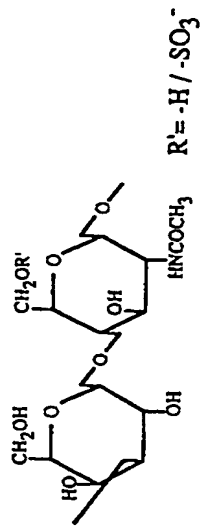
3) ヘパラン硫酸 / (GlcA/IdoA-GlcN)n



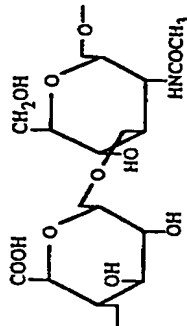
4) ヘパリン / (IdoA/GlcA-GlcN)n



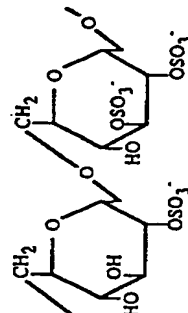
5) ケラタン硫酸 / (Gal-GlcN)n



6) ヒアルロン酸 / (GlcA-GlcN)n

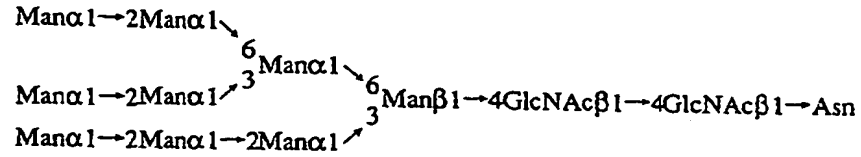


7) デキストラン硫酸 / (Glc-Glc)n

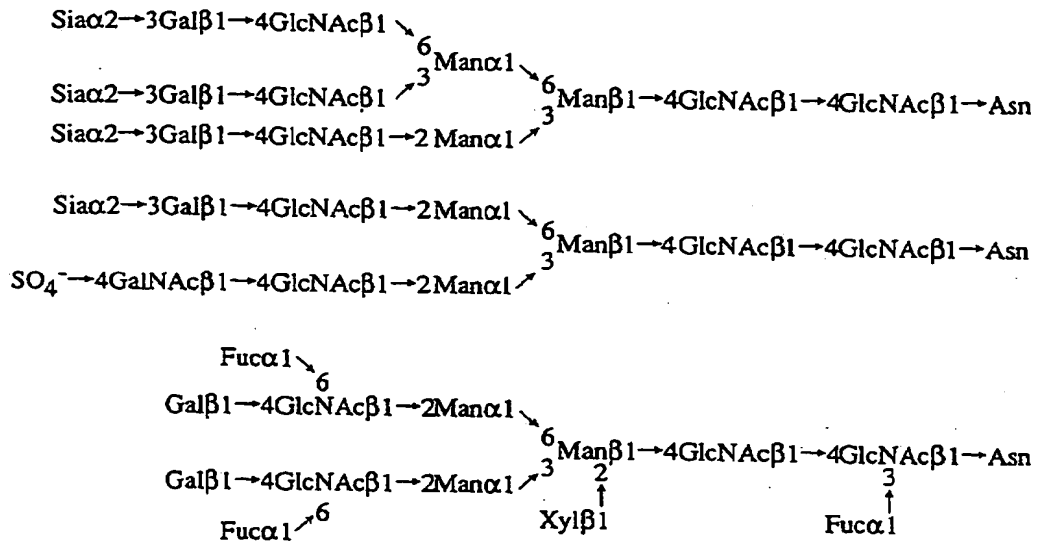


【図2】

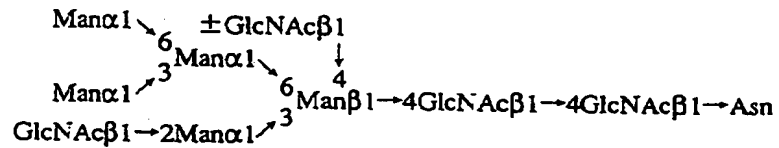
1) 高マンノース型



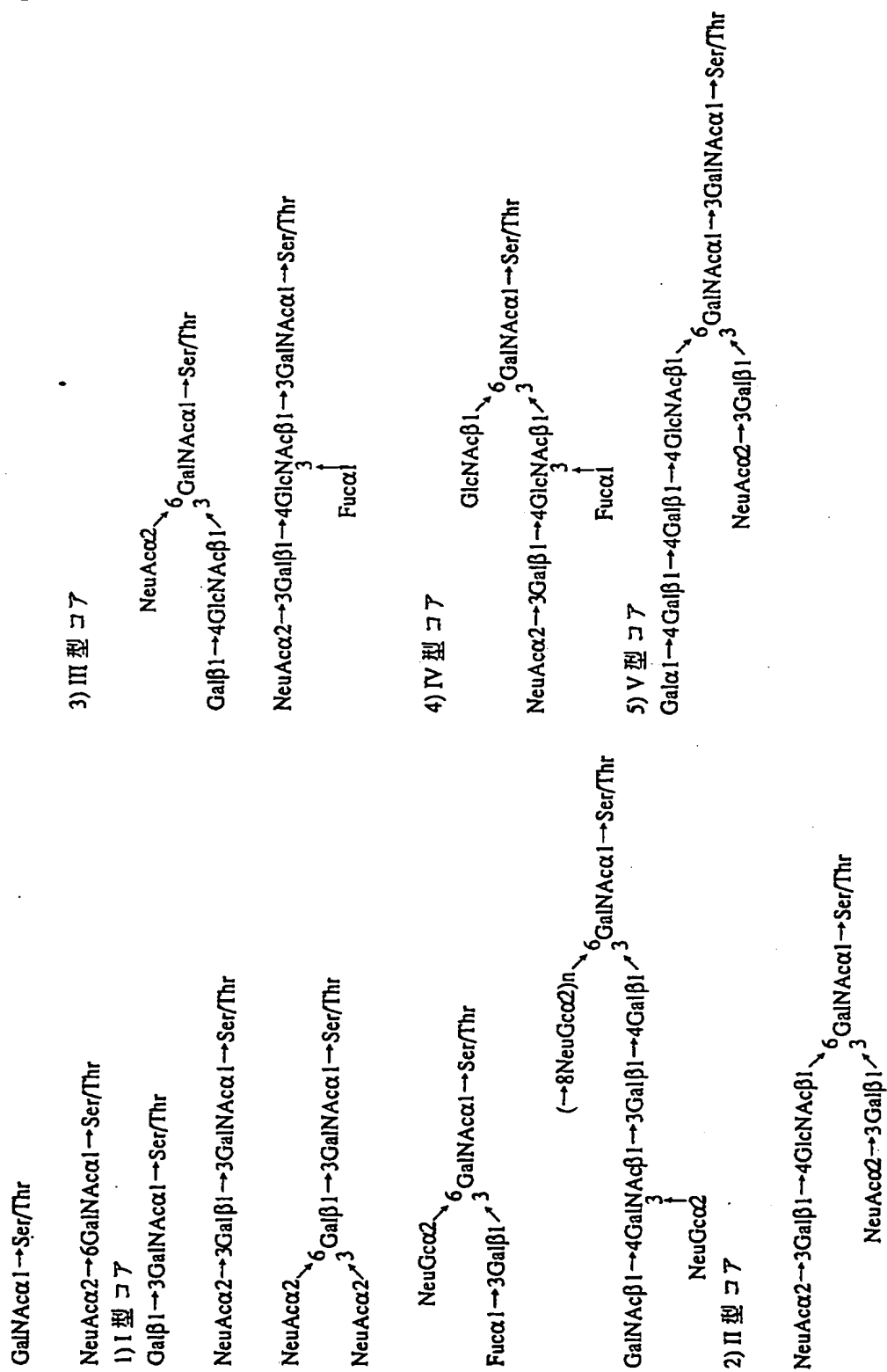
2) 複合型



3) 混成型

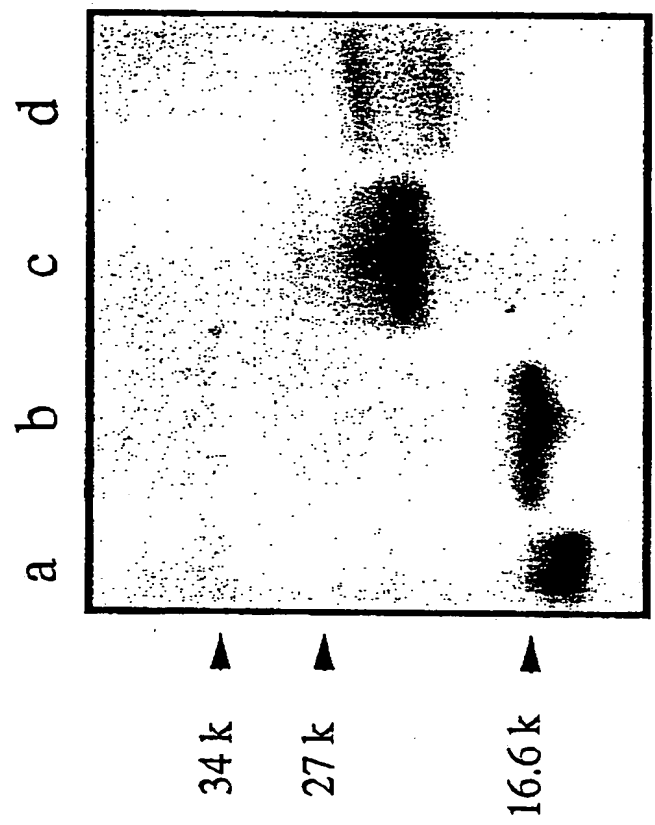


【図 3】



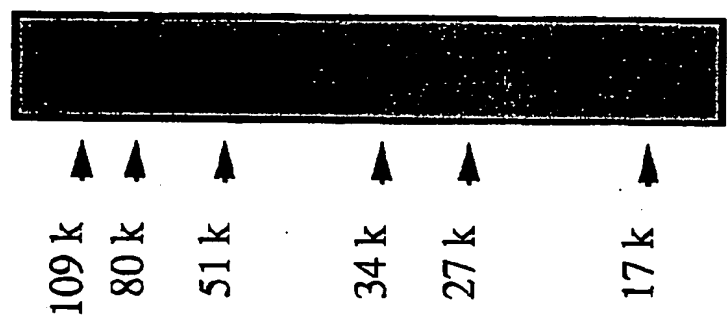
【図 4】

B) N-FGF-1a-IV、および O-FGF-1a 蛋白質の SDS 変性電気泳動図

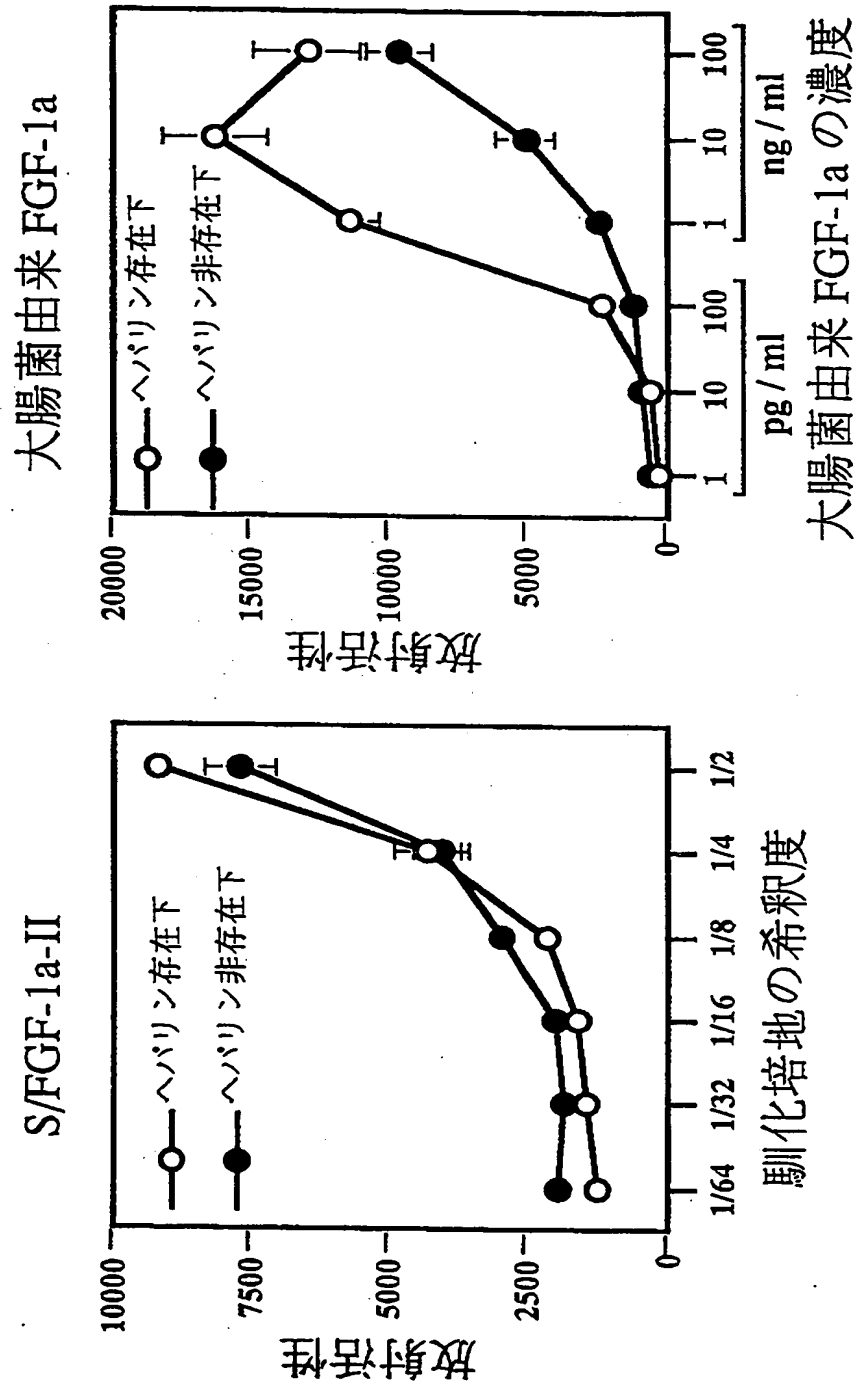


レーン a: 大腸菌で生産した FGF-1a
レーン b: ペプチド N-グリコシダーゼ F で処理することにより
N-型糖鎖を除去した N-FGF-6/1a-II
レーン c: N-FGF-6/1a-II
レーン d: O-FGF-6/1a

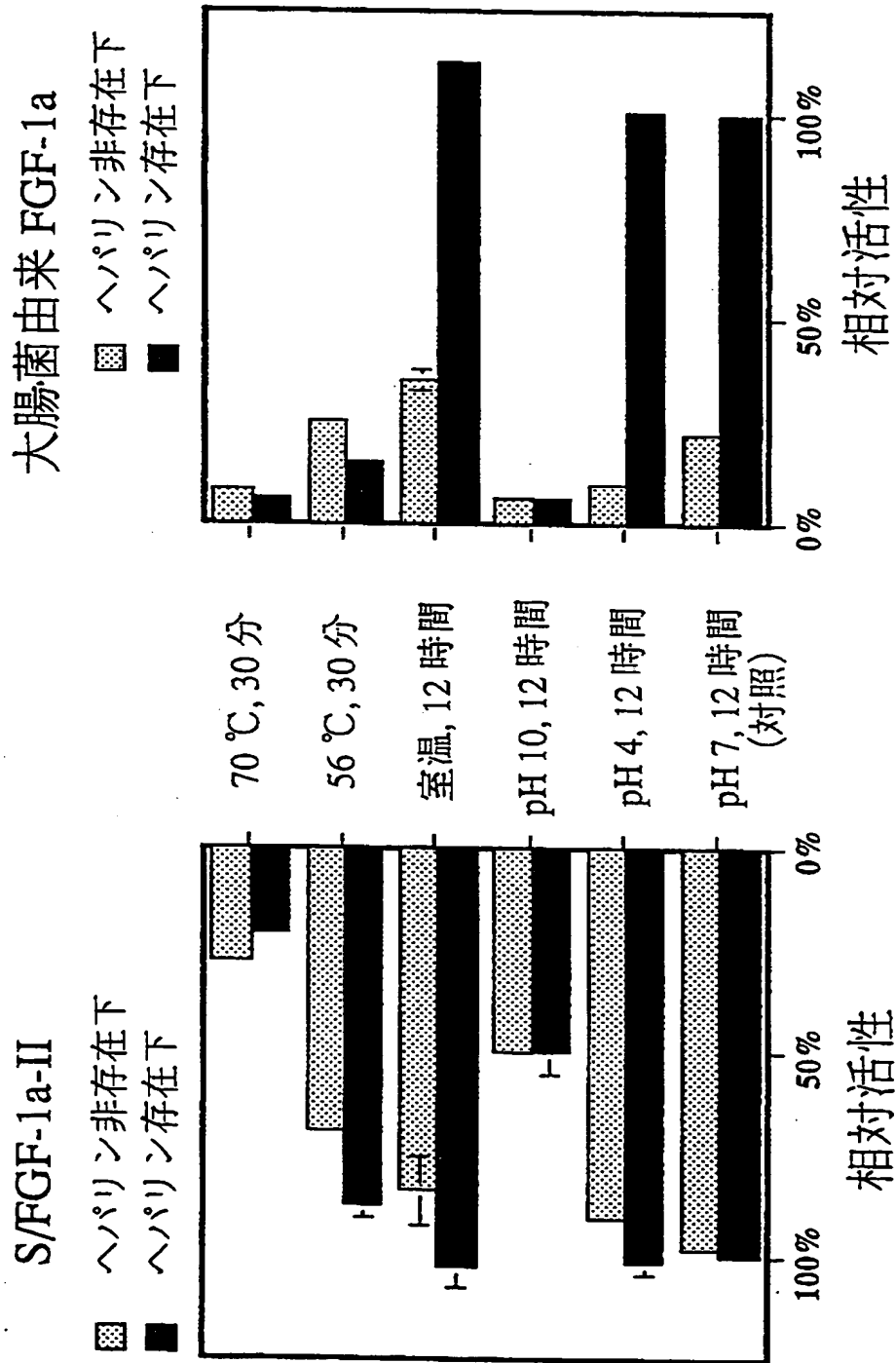
A) S/FGF-1a-II 蛋白質の SDS 変性電気泳動図



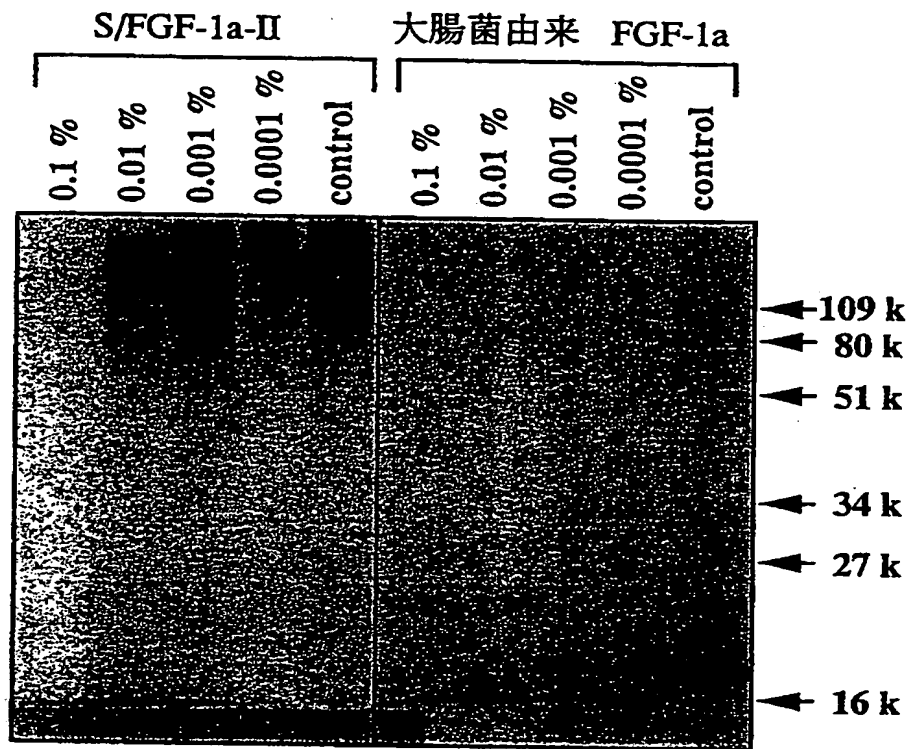
【図5】



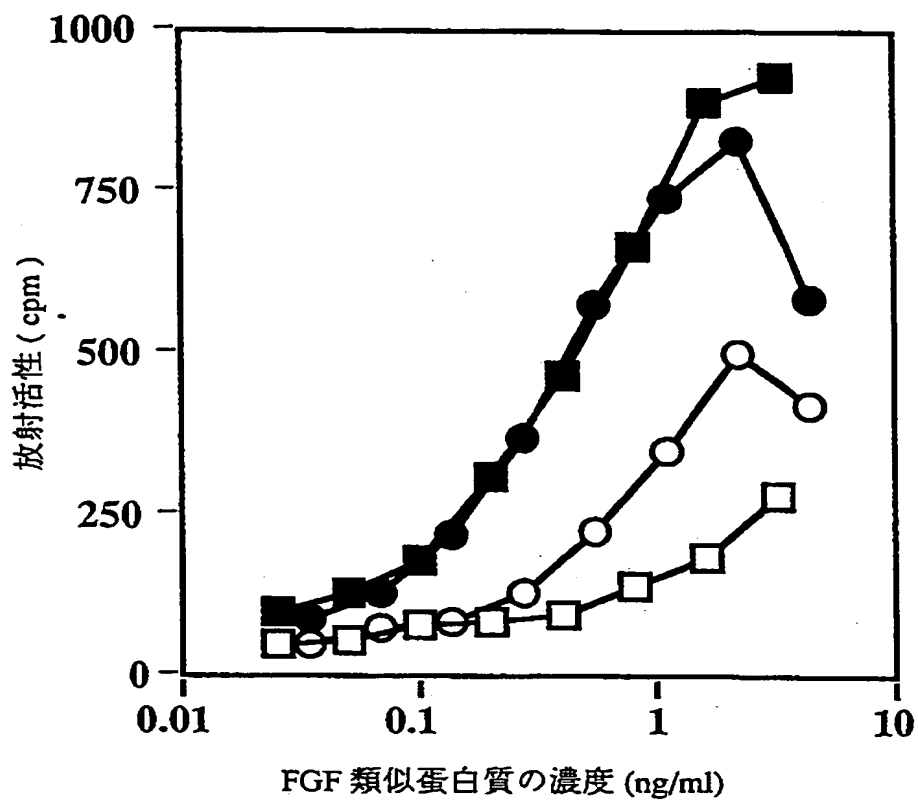
【図6】



【図7】

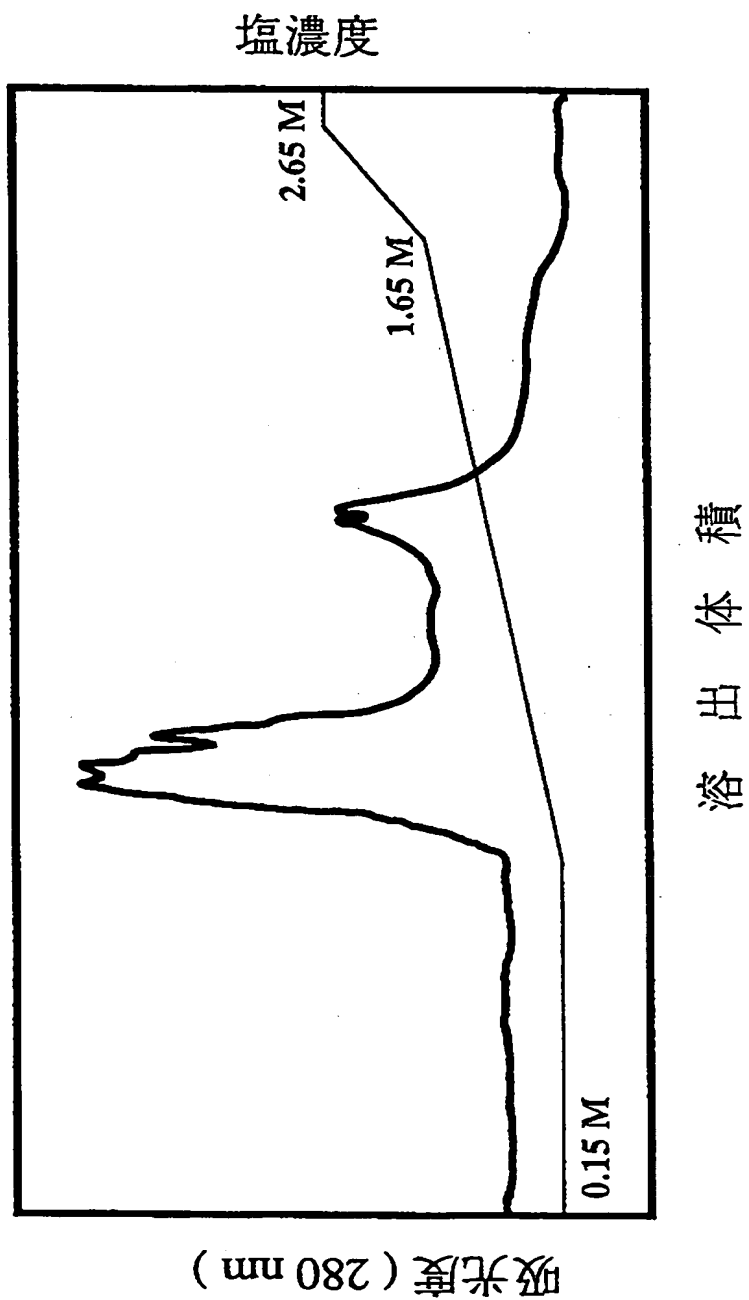


【図 8】



- 大腸菌由来 FGF-1a / ヘパリン存在下
- 大腸菌由来 FGF-1a / ヘパリン非存在下
- N-FGF-6/1a-IV / ヘパリン存在下
- N-FGF-6/1a-IV / ヘパリン非存在下

【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヘパリン結合性タンパク質の機能改質を目的とする。

【解決手段】 糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質、その製造方法およびそれを有効成分として含有する医薬組成物、並びに糖鎖を持たない天然のタンパク質に糖鎖を共有結合させることにより、タンパク質を高機能化する方法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000001144
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
【氏名又は名称】 工業技術院長
【代理人】 申請人
【識別番号】 220000404
【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-3
【氏名又は名称】 工業技術院生命工学工業技術研究所長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日	1990年 9月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
氏 名	工業技術院長